

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-002679

(43)Date of publication of application : 06.01.1995

(51)Int.Cl.

A61K 31/73

A61K 31/73

C08B 37/08

(21)Application number : 05-139356

(71)Applicant : TAMATSUKURI KK

(22)Date of filing : 18.05.1993

(72)Inventor : SHIGEMASA YOSHIHIRO
MINAMI SABURO
TOKURA MITSURU

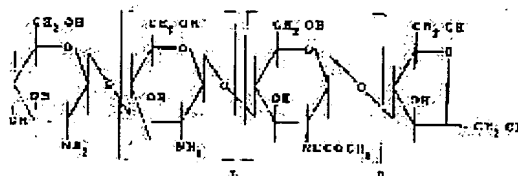
(54) IMMUNOTHERAPEUTIC AGENT FOR TUMOR

(57)Abstract:

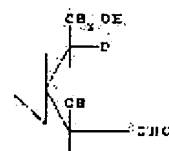
PURPOSE: To obtain the subject therapeutic agent containing an anhydromannitol- terminated chitosan oligomer as an active component and effective for promoting the immunological action of the living body to distinctively differentiate a tumor tissue from a normal tissue and enabling the excision of the tumor tissue by operation.

CONSTITUTION: The objective therapeutic agent contains a chitosan oligomer holding 2,5-anhydromannitol group on a terminal and having a molecular weight of 1,500-10,000 [preferably an oligomer of formula I ($m+n$ is 22-35; n is $\leq 50\%$ of m having an N-acetylamino/amino ratio of 50/50 to 10/90] as an active component. The chitosan oligomer

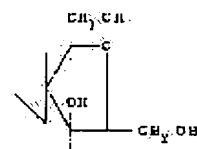
is produced preferably by reacting a high-molecular chitosan obtained from chitinous substance with nitrous acid, neutralizing the depolymerized product to obtain a chitosan oligomer having 2,5-anhydromannose group on a terminal and reducing the oligomer with a hydrogenated boron compound such as sodium borohydride to convert the terminal group of formula II to a group of formula III.



I



II



III

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

19.02.1996

BEST AVAILABLE COPY

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 2786389

[Date of registration] 29.05.1998

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right] 29.05.2001

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-2679

(43) 公開日 平成7年(1995)1月6日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 31/73	ADU	9454-4C		
	ABD			
C 0 8 B 37/08		A 7433-4C		

審査請求 未請求 請求項の数 3 F D (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願平5-139356

(22) 出願日 平成5年(1993)5月18日

(71) 出願人 591036011

玉造株式会社

北海道札幌市豊平区福住2条1丁目4番1号

(72) 発明者 重 政 好 弘

鳥取県鳥取市美萩野1-48

(72) 発明者 南 三 郎

鳥取県鳥取市湖山町北3丁目251 合同宿舎湖山住宅RCK3-401

(72) 発明者 戸 倉 満

北海道札幌市豊平区月寒中央通6-3-35-405

(74) 代理人 弁理士 佐藤 一雄 (外2名)

(54) 【発明の名称】 腫瘍免疫治療剤

(57) 【要約】

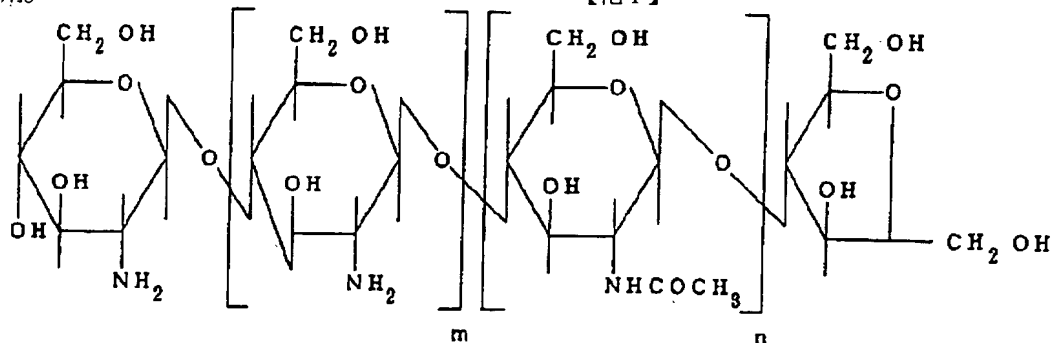
【目的】 生体自身の免疫作用を増強させることにより、遠隔転移を阻止し、腫瘍組織を周囲の健常組織から分離、明確化させて、外科的手術によって腫瘍を切除し易くするための腫瘍免疫治療剤を提供する。

【構成】 末端に2, 5-アンヒドロマンニトール基を有する分子量1, 500~10, 000のキトサンオリゴマーを有効成分として含有することを特徴とする腫瘍免疫治療剤。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】末端に 2, 5-アンヒドロマンニトール基を有する分子量 1, 500~10, 000 のキトサンオリゴマーを有効成分として含有することを特徴とする腫瘍免疫治療剤。



(式中の $m+n$ は 6~60 であり、 n は m の 50% 以下の数である。)

【請求項 3】キトサンオリゴマー中の N-アセチルアミノ基/アミノ基の比率が 50/50~10/90 である

20

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、キトサンオリゴマーを局部注射し、生体自身の免疫作用を活性化して、腫瘍組織を周囲の健常組織から分離、明確化させ、外科的手術によって腫瘍を完全に切除し、腫瘍細胞の転移、増殖をし難くするための腫瘍免疫治療剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】近年、ペット動物等の腫瘍や肉腫等の腫瘍の発生による死亡が、生体の死亡原因の中の多くの部分を占めており、その治療法については種々の研究がなされている。しかしながら、このような腫瘍の発生の原因はウイルス等により発生する原因のはっきりしたものもあるが、その発生原因について未だ明確に解明されるまでに至っていない。しかし、腫瘍の発生は、生体内の器官の組織の一部分である細胞に、機械的刺激、化学物質等の化学的刺激、X線等の物理的刺激、ウイルスの感染等の外因性の刺激、或いは、素因、遺伝、ホルモン異常等の内因性の刺激が与えられることによって正常細胞より腫瘍細胞に変化するものと考えられている。このような腫瘍には病理学的に良性なもの、悪性なものがあるが、悪性な腫瘍及び肉腫においては生命に係わるため特に問題となる。このような悪性の腫瘍細胞の出現に対しては、その初期には生体内の免疫作用によってある程度の阻止を行なうことができるようであるが、増殖が進につれ免疫作用が低下し、更に腫瘍細胞の増殖が活発化して、その器官の正常な機能を営み難くして、機能の低下を起こさせたり、益々この腫瘍細胞が正常細胞を破壊しながら増殖して巨大化する。更に、この腫瘍細胞

30

40

50

【請求項 2】末端に 2, 5-アンヒドロマンニトール基を有するキトサンオリゴマーの構造が、下記の構造式で表わされるものである請求項 1 に記載の腫瘍免疫治療剤。

【化 1】

は血管系或いはリンパ管系を利用して生体内の他の部位にまで遠隔転移して増殖する。そして、最終的には重要な生命維持器官までもを冒して生体を死にまで追いやってしまう。一方、本発明者等は先に「キチン誘導体による菌体の増殖抑制効果」について、第 5 回キチン・キトサンシンポジウム（佐賀）発表要旨集 A03 第 12~13 頁 1991 年 7 月に発表した。しかし、これらの抑制効果はいずれも細菌に対するものであり、しかも、生体内での免疫による作用効果については何等の確認もされていなかった。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】このような腫瘍の治療方法としては、早期発見による早期切除を行なうことが最も優れた治療法ではあるが、實際上、早期に発見することができる腫瘍は極めて限られた症例のみであり、現状の、ほとんどの例ではかなり腫瘍が発育した段階で発見され、それから治療が施されている。従って、その治療法には、現在のところ、外科的療法と、抗癌剤を使用する化学療法、放射線療法、免疫療法とを組み合わせる治療法等が試みられている。しかしながら、これらの治療法を組み合わせても、再発、転移の予測をすることは不可能である。また、現在開発されている抗癌剤は、生体の正常な増殖機能までもを阻害する物質であることから、その物質自体の激しい副作用によって、逆に生体内の防御能力をも破壊してしまうので、結果として、腫瘍の転移を促進させる危険性を十分に孕んでいる。このような腫瘍の完全な治療法を確立することは人類の夢であり、様々な方面から開発が試みられているが、決定的な治療法については現在のところ未だ見出されていない。

【0004】

【課題を解決するための手段】

【発明の概要】本発明者らは、上記問題点を鑑みて鋭意研究を重ねた結果、特定な構造の化合物が、生体内の免

疫作用を増強させることにより、腫瘍組織を周囲の健常組織から分離、明確化させることができるようになり、このように分離した腫瘍部分のみを健常組織を切除することなく、手術により切除することによって治療することができるとの知見を得て、本発明を完成するに至ったものである。すなわち、本発明の腫瘍免疫治療剤は、末端に2, 5-アンヒドロマンニトール基を有する分子量1, 500~10, 000のキトサンオリゴマーを有効成分として含有することを特徴とするものである。

【0005】 [発明の具体的説明]

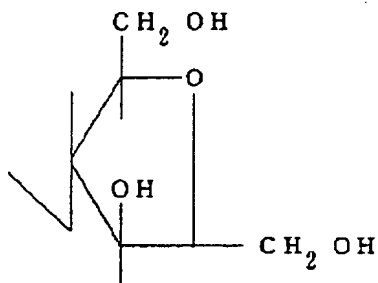
[I] 腫瘍免疫治療剤

(1) 化学構造

本発明の腫瘍免疫治療剤において有効成分として用いられる、末端に2, 5-アンヒドロマンニトール基を有する分子量1, 500~10, 000 (7糖~61糖)、好ましくは3, 000~8, 000 (15糖~48糖)、特に好ましくは4, 500~6, 000 (23糖~36糖)のキトサンオリゴマーとしては、一端に構造式が、

【0006】

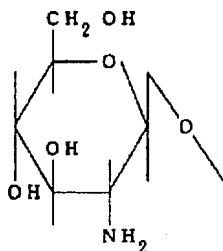
【化2】



【0007】の2, 5-アンヒドロマンニトール基を有しており、他端の構造式が、

【0008】

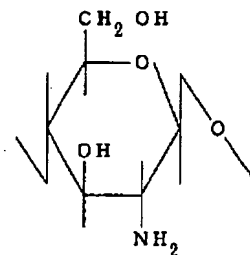
【化3】



【0009】を示すものであり、これら両端が、

【0010】

【化4】

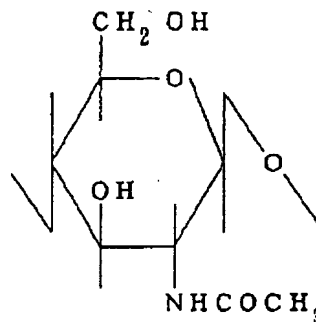


10

【0011】で表わされる構造式の単位の鎖を、6~60個、好ましくは14~47個、特に好ましくは22~35個結合したものであり、その鎖の一部に

【0012】

【化5】



20

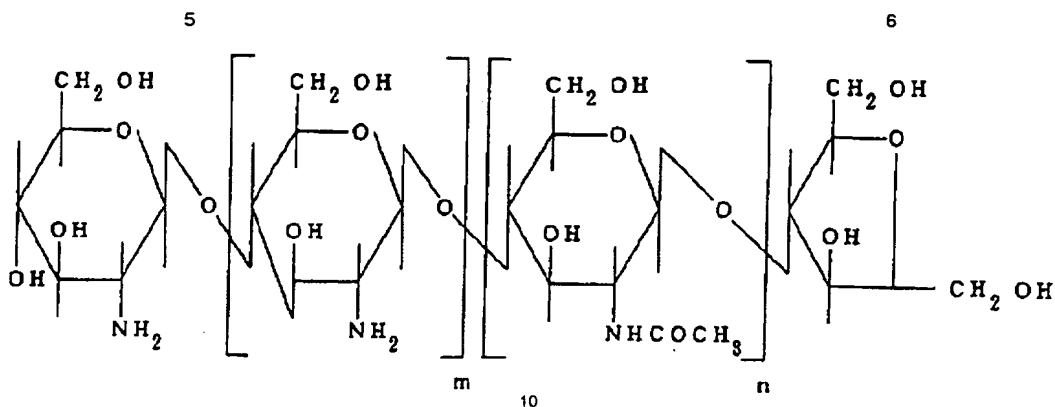
【0013】で表わされる構造式の単位を50%以下の範囲で含むことがある末端に2, 5-アンヒドロマンニトール基を有するキトサンオリゴマーである。

【0014】具体的には、以下に示す構造式で表わされるものである。

【0015】

【化6】

40



【0016】(式中の $m+n$ は0~60、好ましくは14~48であり、特に好ましくは22~36であり、 n は m の50%以下の数である。)

また、これら末端に2, 5-アンヒドロマンニトール基を有するキトサンオリゴマー中のN-アセチルアミノ基/アミノ基との比率が50/50~10/90であることが好ましい。

【0017】(2) 物理・化学的性状

このような末端に2, 5-アンヒドロマンニトール基を有する分子量1, 500~10, 000のキトサンオリゴマーは、比較的分子量であり、末端に2, 5-アンヒドロマンニトール基を有していることから安定なため、水に溶解して使用することができる。また、水溶性であるということは、任意の量を容易に患部へ注入し、局部的にも免疫能を上昇させることができるものと考えられる。従って、本発明のキトサンオリゴマーにおいては分子量が上記範囲内であることが重要である。分子量が上記範囲未満であると移動性に富み過ぎて本発明の効果を十分に発揮することができないおそれがある。更に、分子量が上記範囲を超えると水溶性が低下して本発明の効果を発揮することができない。

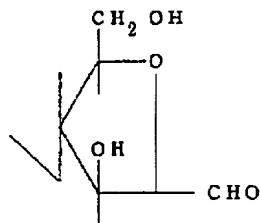
【0018】(3) 末端に2, 5-アンヒドロマンニトール基を有するキトサンオリゴマーの製造

(a) 原料

本発明の腫瘍免疫治療剤に有効成分として含有されるキトサンオリゴマーを製造するために用いられる原料としては、一般式

【0019】

【化7】

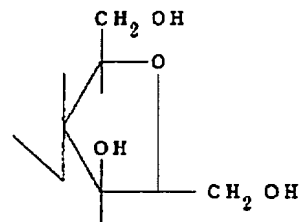


【0020】で表わされる末端に2, 5-アンヒドロマンニトール基を有する分子量1, 500~10, 000の

キトサンオリゴマーを含有しているものである。この末端に2, 5-アンヒドロマンニトール基を有する分子量1, 500~10, 000のキトサンオリゴマーは末端に反応性の高いアルデヒド基を有していることから、反応性に富んでおり、着色や再結合し易いとの欠点を有しているのを、これをアルコール基に還元することによって、末端の構造式を

【0021】

【化8】



【0022】の2, 5-アンヒドロマンニトールとすることにより、本発明の腫瘍に対して効果のある末端に2, 5-アンヒドロマンニトール基を有する分子量1, 500~10, 000のキトサンオリゴマーを有効成分として含有する腫瘍免疫治療剤とすることができる。

【0023】(b) 還元反応

前記2, 5-アンヒドロマンニトール基を有するキトサンオリゴマーの還元反応は、反応性が高いアルデヒド基を有しているのを、着色や再結合し易く、緩やかに還元させることによって2, 5-アンヒドロマンニトール基とすることができる。このような還元反応に使用できる還元剤としては、アルデヒド基を緩やかに還元させることのできる還元剤であれば公知のいずれのものをも選択することもできる。具体的にはラネーニッケル、Ni-カーボンなどのニッケル系水素化還元用触媒、Pd-カーボンなどのパラジウム系水素化還元用触媒、水素化ジイソブチルアルミニウム、有機スズ水素化物、ヒドロシランなどの金属水素化物；水素化アルミニウムリチウム、水素化ホウ素ナトリウム、水素化ホウ素カリウム、水素化ホウ素リチウム、水素化ホウ素カルシウム、水素化ホウ素亜鉛などの金属水素錯化合物；ジボラン、アルキルボランなどを挙げることができる。これら還元剤の中で特に好適な還元剤としては、水素化ジイソブチル

アルミニウム、有機スズ水素化物、ヒドロシランなどの金属水素化物、水素化アルミニウムリチウム、水素化ホウ素ナトリウム、水素化ホウ素カリウム、水素化ホウ素リチウム、水素化ホウ素カルシウム、水素化ホウ素亜鉛などの金属水素錯化合物、ジボラン、アルキルボランなどを挙げることができるが、これらの中でも金属水素錯化合物、特に水素化ホウ素ナトリウム、水素化ホウ素カリウムなどの水素化ホウ素化合物による還元剤を用いることが最適である。還元剤はキトサンオリゴマー中の2, 5-アンヒドロマンノース基1モル当たり、一般に1モル以上、好ましくは1.5~3モルの量比で添加して、キトサンオリゴマー中の2, 5-アンヒドロマンノース基を2, 5-アンヒドロマンニトール基に還元する。該還元反応は一般に100℃以下、好ましくは室温以下の温度で、一般に常圧下で、数時間行なわれる。

【0024】(c) 2, 5-アンヒドロマンノース基含有キトサンオリゴマーの製造

上記末端に2, 5-アンヒドロマンノース基を有するキトサンオリゴマーの製造用の原料として用いられる末端に2, 5-アンヒドロマンノース基を有するキトサンオリゴマーは、通常、海老、蟹などの甲殻類、カブト虫、コオロギなどの昆虫類、シイタケ、糸状菌類の細胞壁の構成成分として含有されているキチン質を希塩酸で処理して炭酸カルシウムを除き、アルカリ溶液で短時間処理してタンパク質等を除いたキチンを濃アルカリで加熱して脱アセチル化させて得られた高分子のキトサンを、亜硝酸又は亜硝酸塩と反応させて解重合させて、中和することによって得られたものである。更に、特定な分子量のキトサンオリゴマーにまで分画することによって、本発明の腫瘍免疫治療剤の有効成分として含有されるキトサンオリゴマーを得ることができる。このような高分子のキチン又はキトサンを、亜硝酸と反応させて解重合させて、中和し、更に、特定な分子量のキトサンオリゴマーにまで分画する方法については、特開平4-103602号公報に記載される方法によって製造することができる。

【0025】(d) 生成物

このように各種多糖類毎に分別して得られる一定した分子量のキトサンオリゴ糖として単離すれば、効力の高い特定の分子量のキトサンオリゴ糖を高濃度に含有していることから、より一層高い効果を発揮させることができる。また、還元末端側に2, 5-アンヒドロマンニトール基を有するキトサンオリゴマーは、水溶性で、反応性が低く、熱安定性が高いので、着色し難く、極めて安定な化合物である。

【0026】[II] 医薬組成物の調製

(1) 腫瘍免疫治療剤

上記のように分画して得られる分子量が一定した1, 000~12, 000の範囲のものを、更にキトサンオリゴマーの貧溶媒で、かつ水と良く混合する析出剤によ

て分離精製を行ない、分子量が1, 500~10, 000の範囲内の2, 5-アンヒドロマンニトール基を有するキトサンオリゴマーのみを単離して、これをそのまま或いは、薬理的に許容される塩として、水に溶解して免疫治療剤が調製される。

【0027】(2) 医薬組成物の調製

本発明の末端に2, 5-アンヒドロマンニトール基を有する分子量1, 500~10, 000のキトサンオリゴマー及びその薬理的に許容される塩を有効成分として含有してなる腫瘍免疫治療剤は、人及び人以外の動物に、その投与経路に応じた適当な剤形とした医薬組成物に形成される。具体的には静注、筋注等の注射剤、直腸投与剤、油脂性剤、水性剤等の種々の形態に調製することができる。これらの中でも腫瘍の周囲或いは腫瘍内に分割して注射することが好ましい。これらの各種製剤は、通常用いられている賦形剤、増量剤、結合剤、湿潤化剤、崩壊剤、表面活性剤、滑沢剤、分散剤、緩衝剤、保存剤、溶解補助剤、防腐剤、矯味矯臭剤、無痛化剤、安定剤等を配合して、常法によって製造することもできる。

【0028】[III] 治療

(1) 治療対象

本発明の腫瘍免疫治療剤を用いることにより効果を発揮することができる病状としては、各種腫瘍細胞によって生じた、いぼ状、茸状、ポリープ状、乳頭状、樹皮状、ハナキャベツ状等の形状をした腫瘍であり、病理学的には、乳頭腫、腺腫、嚢腫等の良性上皮性腫瘍や、線維腫、脂肪腫、軟骨腫、骨腫、筋腫、血管腫等の非良性上皮性腫瘍、或いは、癌腫等の悪性上皮性腫瘍や、肉腫等の悪性非上皮性腫瘍を挙げることができる。これら腫瘍の中でも、特に血管、リンパ管等を通じて他の臓器に遠隔転移して、生体の生命まで奪うまでに増殖する癌腫及び肉腫等の悪性の腫瘍において特に顕著な効果が認められる。これら腫瘍に適用する場合には、後述のように、免疫異種抗体による免疫異物除去作用が発揮されるためであろうと思われる。また、上記腫瘍に特別に効果が認められるが、腫瘍においても免疫効果を発揮することができ、腫瘍の場合には手術による切除を行なわなくても治療することができる。

【0029】(2) 投与

(a) 投与方法

本発明の腫瘍免疫治療剤の投与方法としては、動物の場合には腹腔内注射、皮下注射、静脈又は動脈への血管内注射及び注射による局所投与、患部への直接塗布等の方法が、人の場合には静脈又は動脈への血管内注射及び注射による局所投与等の方法、患部への直接塗布等の方法を挙げることができるが、特に注射針及び注射器等を使用して、直接腫瘍内に或いは腫瘍の周囲に注入する方法が好ましい。

【0030】(b) 投与量

本発明の腫瘍免疫治療剤の投与量としては、動物試験の結果及び種々の状況を勘案して、連続的又は完結的に投与した時に総投与量が一定量を越えないように定められる。具体的には投与量は、投与方法、患者又は被処理動物の状況、例えば、年齢、体重、性別、感受性、食餌、投与時間、併用する薬剤、患者又はその病気の程度に応じて変化することとは言うまでもなく、また、一定の条件の下における適量と投与回数は、上記指針を基として専門医の適量決定試験によって決定されなければならない。具体的には、単回投与毒性については、今のところ観察されていないが、投与量としては体重1kg当たり100mg以下で、有意量の投与をすれば良い。

【0031】(3) 治療効果

本発明の腫瘍免疫治療剤が腫瘍に効果を発揮することができる理由は現在のところ未だ解明できていないが、本発明の腫瘍免疫治療剤は、腫瘍細胞自体に直接影響を与える作用は存在していないように観察されるが、本発明の腫瘍免疫治療剤を適用することにより、図7に示すように、腫瘍組織を周囲の健常組織から分離、明確化する働きが観察されるとの現象を有していることから、以下に示す①～②の如き作用、効果があるのではないかと考える。

【0032】① 腫瘍の増殖過程は腫瘍細胞自体の分裂増殖によってもたらされるものであるが、この過程には栄養血管の増数が必要となる。また、腫瘍細胞が増殖する際には、周囲組織に対してヘパラーゼ等の蛋白質分解酵素を産出することが知られている。しかし、これら腫瘍細胞の産出する血管増殖因子の産生能、酵素産性能或いは産生された物質自体を阻害或いはブロックすることができる効果があることから免疫作用があるものと考えられる。

② 可移植性の腫瘍細胞が生体に接種した場合、本剤が腫瘍の生着、増殖及び器官の機能停止を防止することにより免疫反応の低下を防いで、マクロファージや多形核白血球(PMN)を主体とする生体内のどん食細胞を活性化させることによって腫瘍細胞を孤立させることができるものではないかと考える。また、本発明の腫瘍免疫治療剤を腫瘍に適用する場合の効果も、非特異的免疫担当細胞による免疫異物除去作用によって治癒するものと思われる。

【0033】

【実施例】以下に実施例を挙げて詳細に説明するが、本発明はかかる実施例に限定されるものではない。

実施例1～3

(1) 末端に2, 5-アンヒドロマンニトール基を有するキトサンオリゴマーの製造

2, 5-アンヒドロマンノース基を有するキトサンオリゴマーの製造

内容積500ミリリットルの攪拌機付ガラス製ビーカーに30メッシュパスのフレーク状キトサン(分子量: 4

0, 000) 10gを入れて、これに酢酸水溶液100ミリリットル(可溶化剤/水: 10容量%)を攪拌下に少量づつ加えて溶解し、氷水浴で充分冷却して4℃とした。次いで、亜硝酸ナトリウム10%水溶液14.5ミリリットル(亜硝酸/キトサン中のグルコサミン残基(モル比): 0.5)を加え、水溶液中4℃で攪拌下に2時間反応させて、2, 5-アンヒドロマンノース基を有するキトサンオリゴマーを製造した。

【0034】2, 5-アンヒドロマンニトール基を有するキトサンオリゴマーの製造

反応終了後、15ミリリットルの濃アンモニア水で中和させた後、更に水素化ホウ素ナトリウム1.6g(亜硝酸ナトリウムに対して2倍モル)を加えて、室温で一晩攪拌して、還元反応を行なって、2, 5-アンヒドロマンニトール基を有するキトサンオリゴマーを製造した。

【0035】分画

還元反応終了後、反応液から不溶物を取り除くために濾過し、濾液を100ミリリットルまで濃縮した。次いで、これにメタノールを加えて沈殿させた。その後、メタノールの使用量は濃縮液: メタノールにして1: 3(第1分画)、1: 5(第2分画)、1: 10(第3分画)にて分画させた。更に、濃縮を乾固するまで行ない、メタノールとアセトンを加えて生成物を沈殿させた。その際、メタノール: アセトンが1: 2(第4分画)にして分別した。これらの沈殿は十分にアセトン、エーテルで洗浄し、真空デシケーター内で乾燥させた。上記分画された第1～4分画の沈殿物を採取し、この沈殿物を赤外線分析、高速液体クロマトグラフィー及び脱アセチル化分析を行なって、特に第3分画生成物については、平均分子量が5, 150、N-アセチルアミノ基/アミノ基との比率が40/60である2, 5-アンヒドロマンニトール基を有するキトサンオリゴマーであることが確認された。

【0036】その赤外線分析、高速液体クロマトグラフィー及び元素分析の結果を図1及び図2～5に示す。なお、高速液体クロマトグラフィー分析における条件は以下の通りであった。

カラム: アサヒパック GFA-30F

流速: 0.3ミリリットル/分

温度: 50℃

移動相: 0.5%酢酸緩衝液

pH: 4.0

その結果を図2～5に示す。各分画中の生成物は以下に示すものであった。

【0037】第1分画 [図2]

収 量: 7.2重量%

ピークa-1: 原料キトサン

ピークa-2: キトサンオリゴマー88.5%

分子量: 40,000～1,300 (246糖～7糖)

ピークa-3: 酢酸ナトリウム

【0038】第2分画 [図3]

収 量: 15.2重量%

ピークb-1: 原料キトサン

ピークb-2: キトサンオリゴマー99.7モル%

分子量: 45,000~1,300、(277糖~7糖)

ピークb-3: 酢酸ナトリウム

【0039】第3分画 [図4]

収 量: 8.4重量%

ピークc-1: キトサンオリゴマー100モル%

分子量: 25,000~1,000、(154糖~5糖)

ピークc-2: 酢酸ナトリウム

【0040】第4分画 [図5]

収 量: 42.2重量%

ピークd-1: キトサンオリゴマー97.4モル%

分子量: 25,000~1,300、(154糖~7糖)

ピークd-2: キトサンオリゴマー2.6モル%

分子量: 1,300~900、(7糖~5糖)

ピークd-3~7: 各種塩

【0041】腫瘍免疫治療剤の調製

上記キトサンオリゴマーの製造によって製造した第3分画の平均分子量が5,150、N-アセチルアミノ基/アミノ基との比率が40/60である末端に2,5-アンヒドロマンニトール基を有するキトサンオリゴマー250mgを、生理食塩水100mlに溶解して、2.5mg/mlの濃度の末端に2,5-アンヒドロマンニトール基を有するキトサンオリゴマーを有効成分として含

表

有する腫瘍免疫治療剤を調製した。

【0042】各種腫瘍に対する抗腫瘍効果

表1に示す犬3例の腫瘍発生後凡そ1カ年以上経過したものと考えられるが、これら腫瘍に対して、本腫瘍免疫治療剤を注射器を用いて腫瘍の周囲に注入した。すなわち、実施例1に対しては25mg(2.5mg/ml)を3~4日おきに5回、実施例2に対しては3.75mg(2.5mg/ml)を3~4日おきに10回、実施例3に対しては25mg(2.5mg/ml)を3~4日おきに5回注入した。注入後の一般状態及び局所反応について肉眼的に観察した。注入後、実施例1~3に対しては腫瘍の摘出手術を実施し、摘出した腫瘍に対しては組織学的な検査を行ない観察を実施したところ、表1に示すような、いずれも悪性の腫瘍であった。特に、実施例2においては、注入前に疼痛を訴え、跛行し、腫瘍は硬固であったものが、注入後、第5回目の注入で腫瘍は軟化し、第6回目の注入で跛行が消失した。腫瘍も若干縮小したが、第10回目の注入でも図6に示すように腫瘍の大きさにさほどの変化がないので摘出手術を行なった。摘出された腫瘍は、図7に示すように、健常細胞との限界が明瞭であり、簡単に摘出することができた。また、摘出された腫瘍を病理組織学的検査をしたところ、図8に示すような紡錘細胞が渦巻状に配列する神経鞘腫の特徴像を示していた。

【0043】

1

	動物	種類	性別	発生部位	大きさ	腫瘍の状況		転帰	組織分類
						初診	投与後		
実施例1	犬	チャウ	雄	腹壁腫瘍	手拳大	固着	分離	治癒	体表腫瘍
実施例2	犬	雑種	雄	前腕	鶏卵大	固着	分離	治癒	悪性神経鞘腫
実施例3	犬	柴	雄	肛門腫瘍	ビー玉大	固着	分離	治癒	肛門線腫

【0044】これらの実施例の結果から、本剤の注入により、生体自身の免疫作用が惹起され、創内の正常化が速やかに生じて、腫瘍との分界が明確に進行したものと考えられる。本剤には腫瘍の育成を阻止する効果は存在しないものの、腫瘍を健常組織から分離させる作用があることが明らかになった。このようなことから、簡単な外科的手術によって腫瘍の完全な摘出術が可能となり、摘出手術後2カ年経過するが、その後の再発もみられないことから転移は起こらなかったものと判断される。

表

2

	動物	種類	性別	疾患	初診時滲出	2日目滲出	7日目滲出
実施例4	猫	雑種	雄	皮下膿瘍	+++	-	治癒

実施例4~6

表2に示す猫4例の体表の外傷性感染症を生理食塩水で洗浄した後、実施例1にて調製した生理食塩水に溶解した末端に2,5-アンヒドロマンニトール基を有するキトサンオリゴマー(2.5mg/mlの濃度)を有効成分として含有する腫瘍免疫治療剤を創腔内に1~2ml注入した。創は肉眼的に毎日観察した。その結果を表2に示す。

【0045】

実施例 5	猫 雑種 雄	皮下膿瘍	+++	-	治 癒
実施例 6	猫 雑種 雄	皮下膿瘍	+++	-	治 癒

【0046】これらの3例は初診時いずれも激しい滲出が認められたが、本剤の注入により速やかに滲出が停止し、7日目には創は治癒していた。

【0047】

【発明の効果】これらの実験結果から、このような効果が得られるのは、腫瘍周囲組織に対する抗炎症効果と、腫瘍増殖に対する血管新生と腫瘍産生酵素のブロックによるものと理解される。特に、腫瘍増殖に対する血管新生のブロックは本剤による免疫増強作用の結果、腫瘍組織が周囲から孤立させられたために起こったものと思われる。腫瘍組織の外科的な摘出は、完璧な抗腫瘍剤が存在していない現状においては、腫瘍治療の第1番目に選択される方法であるが、これまでは悪性腫瘍において健康組織との境界が不明瞭なため手術が極めて不正確にならざるを得なかった。しかしながら、本剤の適用により、極めて悪性度の高い神経鞘腫や肛門線腫においても分離できることになることから、腫瘍の外科治療面における手術療法の範囲を大きく発展させる効果がある。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、本発明実施例において分画された分子量25,000~1,300の2,5-アンヒドロマンニトール基を有するキトサンオリゴマーの赤外線分析によって描かれた図である。

【図2】図2は、本発明実施例において分画された、第1分画の2,5-アンヒドロマンニトール基を有するキトサンオリゴマーの高速液体クロマトグラフィー分析によって描かれた図である。

【図3】図3は、本発明実施例において分画された、第2分画の2,5-アンヒドロマンニトール基を有するキトサンオリゴマーの高速クロマトグラフィー分析によって描かれた図である。

【図4】図4は、本発明実施例において分画された、第

3分画の2,5-アンヒドロマンニトール基を有するキトサンオリゴマーの高速クロマトグラフィー分析によって描かれた図である。

【図5】図5は、本発明実施例において分画された、第4分画の2,5-アンヒドロマンニトール基を有するキトサンオリゴマーの高速クロマトグラフィー分析によって描かれた図である。

【図6】図6は本発明実施例における生物の腫瘍部位の形態の外観を表わす写真である。

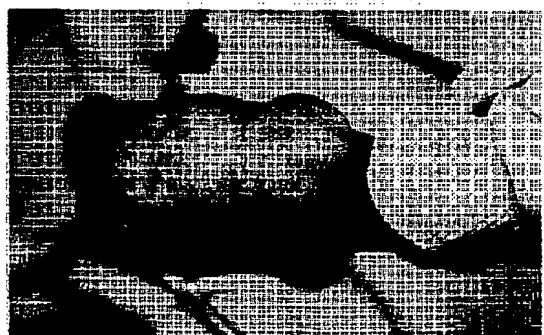
【図7】図7は、本発明実施例における腫瘍と健康組織との限界が明瞭に分離されていることを示す生物の形態を表わす写真である。

【図8】摘出された腫瘍の生物の病理組織学的形態の所見を示す写真である。

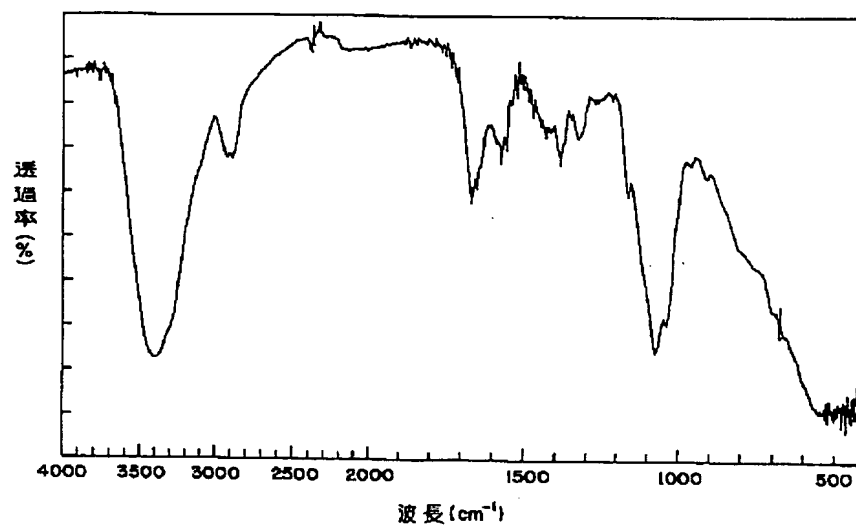
【符号の説明】

- a-1 原料キトサン、
- a-2 分子量40,000~1,300の2,5-アンヒドロマンニトール基を有するキトサンオリゴマー、
- a-3 酢酸ナトリウム、
- b-1 原料キトサン、
- b-2 分子量45,000~1,300の2,5-アンヒドロマンニトール基を有するキトサンオリゴマー、
- b-3 酢酸ナトリウム、
- c-1 分子量25,000~1,000の2,5-アンヒドロマンニトール基を有するキトサンオリゴマー、
- c-2 酢酸ナトリウム、
- d-1 分子量25,000~1,300の2,5-アンヒドロマンニトール基を有するキトサンオリゴマー、
- d-2 分子量1,300~900の2,5-アンヒドロマンニトール基を有するキトサンオリゴマー、
- d-3~7 各種塩

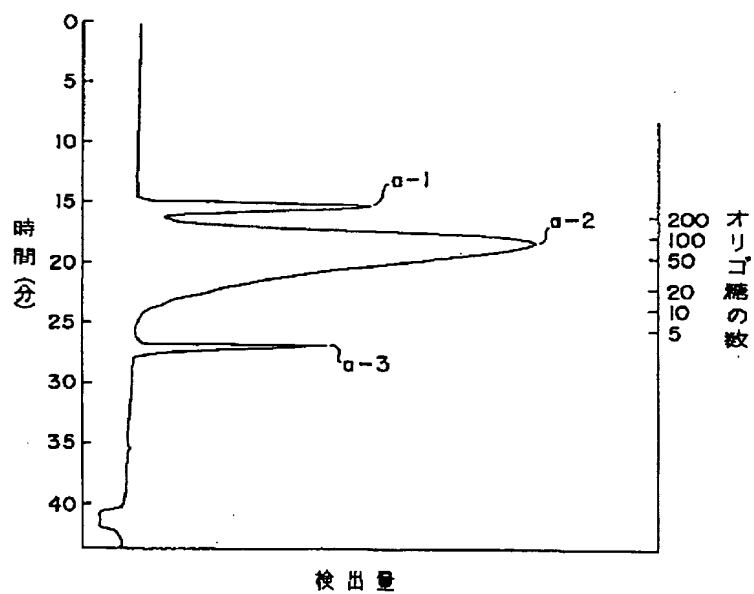
【図6】



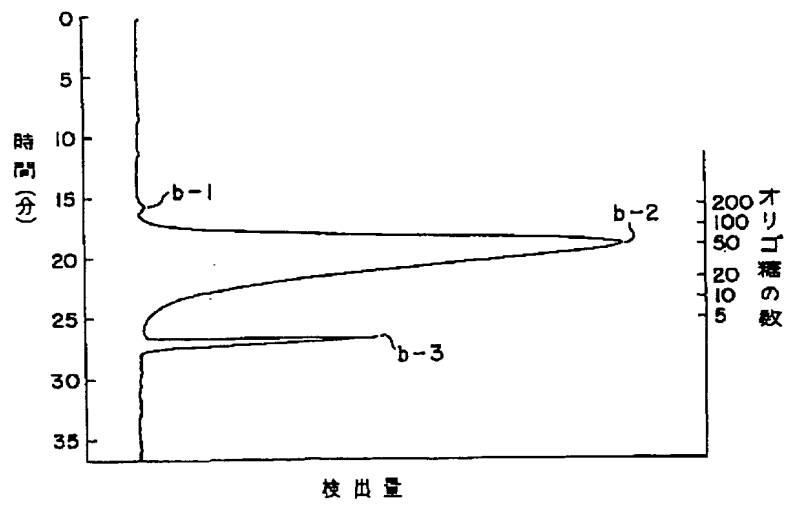
【図1】



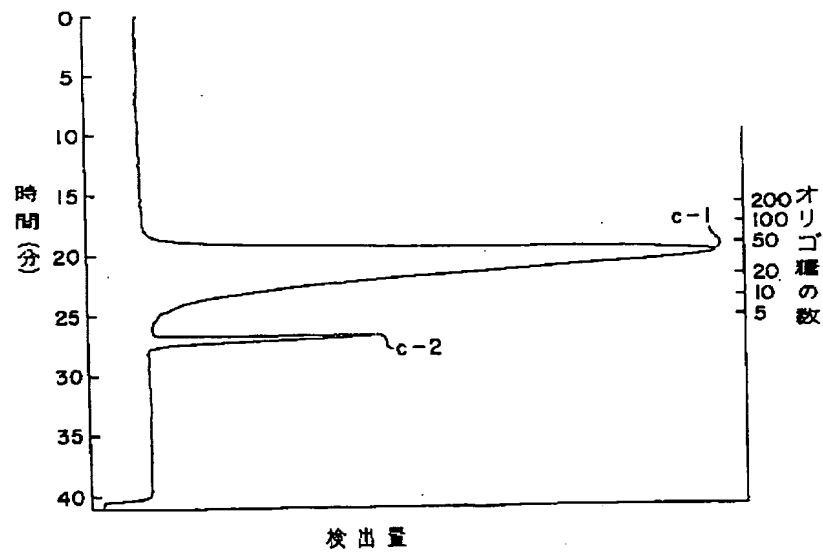
【図2】



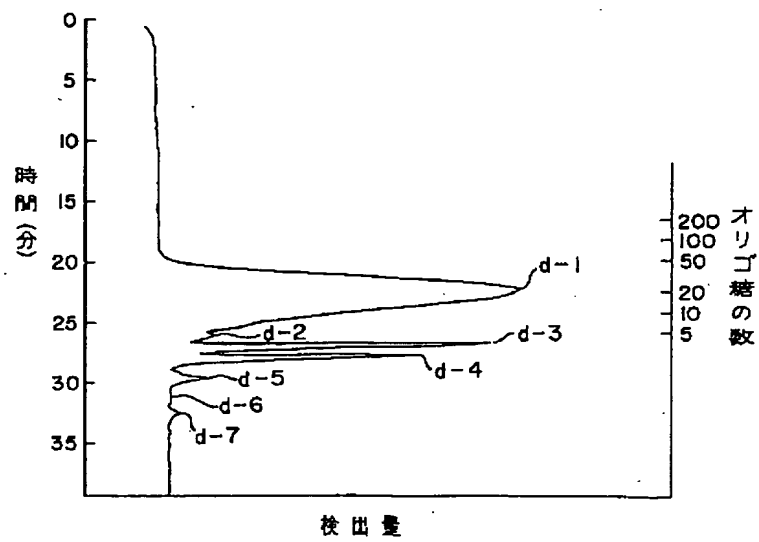
【図3】



【図4】



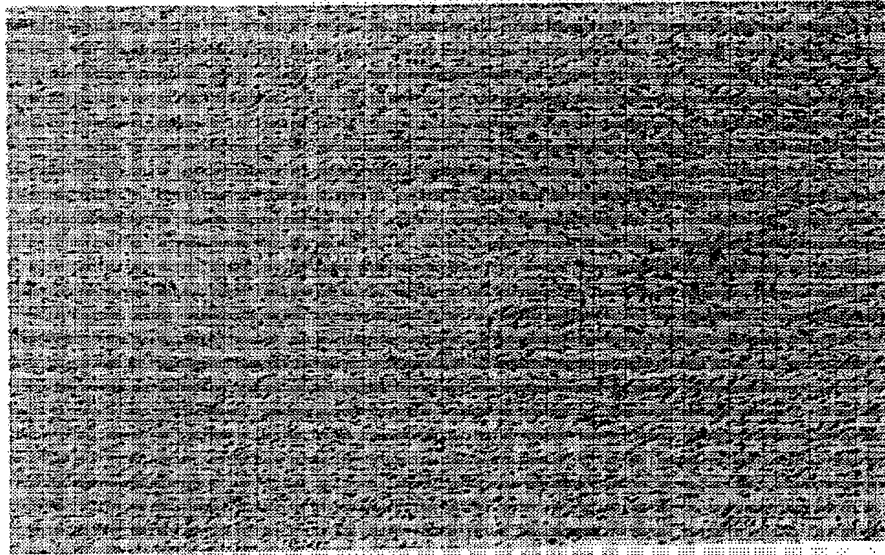
【図5】



【図7】



【図8】



【手続補正書】

【提出日】平成5年7月8日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0002

【補正方法】変更

【補正内容】

【0002】

【従来の技術】近年、ペット動物等の腫瘍や肉腫等の腫瘍の発生による死亡が、生体の死亡原因の中の多くの部分を占めており、その治療法については種々の研究がな

されている。しかしながら、このような腫瘍の発生の原因はウイルス等により発生する原因のはっきりしたものもあるが、その発生原因について未だ明確に解明されるまでに至ってはいない。しかし、腫瘍の発生は、生体内の器官の組織の一部分である細胞に、機械的刺激、化学物質等の化学的刺激、X線等の物理的刺激、ウイルスの感染等の外因性の刺激、或いは、素因、遺伝、ホルモン異常等の内因性の刺激が与えられることによって正常細胞より腫瘍細胞に変化するものと考えられている。このような腫瘍には病理学的に良性なものと、悪性なものとがあるが、悪性な腫瘍及び肉腫においては生命に係わるため特に問題となる。このような悪性の腫瘍細胞の出現に対しては、その初期には生体内の免疫作用によってある程度の阻止を行なうことができるようであるが、増殖が進むにつれ免疫作用が低下し、更に腫瘍細胞の増殖が活発化して、その器官の正常な機能を営み難くして、機能の低下を起させたり、益々この腫瘍細胞が正常細胞を破壊しながら増殖して巨大化する。更に、この腫瘍細胞は血管系或いはリンパ管系を利用して生体内の他の部位にまで遠隔転移して増殖する。そして、最終的には重要な生命維持器官までもを冒して生体を死にまで追いやってしまう。一方、本発明者等は先に「キチン誘導体による菌体の増殖抑制効果」について、第5回キチン・キトサンシンポジウム（佐賀）発表要旨集 A03 第12～13頁 1991年7月に発表した。しかし、これらの抑制効果はいずれも細菌に対するものであり、しかも、生体内での免疫による作用効果については何等の確認もされていなかった。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0003

【補正方法】変更

【補正内容】

【0003】

【発明が解決しようとする課題】このような腫瘍の治療方法としては、早期発見による早期切除を行なうことが最も優れた治療法ではあるが、實際上、早期に発見することができる腫瘍は極めて限られた症例のみであり、現状の、ほとんどの例ではかなり腫瘍が発育した段階で発見され、それから治療が施されている。従って、その治療法には、現在のところ、外科的療法と、抗癌剤を使用する化学療法、放射線療法、免疫療法とを組み合わせる治療法等が試みられている。しかしながら、これらの治療法を組み合わせても、再発、転移の予測をすることは不可能である。また、現在開発されている抗癌剤は、生体の正常な増殖機能までもを阻害する物質であることから、その物質自体の激しい副作用によって、逆に生体内の防御能力をも破壊してしまうので、結果として、腫瘍の転移を促進させる危険性を十分に孕んでいる。このような腫瘍の完全な治療法を確立することは人

類の夢であり、様々な方面から開発が試みられているが、決定的な治療法については現在のところ未だ見出だされていない。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0016

【補正方法】変更

【補正内容】

【0016】（式中の $m+n$ は6～60、好ましくは14～47であり、特に好ましくは22～35であり、 n は m の50%以下の数である。）

また、これら末端に2, 5-アンヒドロマンニトール基を有するキトサンオリゴマー中のN-アセチルアミノ基／アミノ基との比率が50／50～10／90であることが好ましい。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0017

【補正方法】変更

【補正内容】

【0017】（2） 物理・化学的性状

このような末端に2, 5-アンヒドロマンニトール基を有する分子量1, 500～10, 000のキトサンオリゴマーは、比較的低分子量のため水溶性であり、末端に2, 5-アンヒドロマンニトール基を有していることから安定なため、水に溶解して使用することができる。また、水溶性であるということは、任意の量を容易に患部へ注入し、局部的にも免疫能を上昇させることができるものと考えられる。従って、本発明のキトサンオリゴマーにおいては分子量が上記範囲内であることが重要である。分子量が上記範囲未満であると移動性に富み過ぎて本発明の効果を十分に発揮することができないおそれがある。更に、分子量が上記範囲を超えると水溶性が低下して本発明の効果を発揮することができない。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0020

【補正方法】変更

【補正内容】

【0020】で表わされる末端に2, 5-アンヒドロマンノース基を有する分子量1, 500～10, 000のキトサンオリゴマーを含有しているものである。この末端に2, 5-アンヒドロマンノース基を有する分子量1, 500～10, 000のキトサンオリゴマーは末端に反応性の高いアルデヒド基を有していることから、反応性に富んでおり、着色や再結合して毒性を示したりする可能性が高いとの欠点を有しているため、これをアルコール基に還元することによって、末端の構造式を

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0026

【補正方法】変更

【補正内容】

【0026】[I I] 医薬組成物の調製

(1) 腫瘍免疫治療剤

上記のように分画して得られる分子量が一定した1, 000~12, 000の範囲のものを、更にキトサンオリゴマーの貧溶媒で、かつ水と良く混合する析出剤によって分離精製を行ない、分子量が1, 500~10, 000の範囲内の2, 5-アンヒドロマンニトール基を有するキトサンオリゴマーのみを単離して、これをそのまま或いは、薬理学的に許容される塩として、水に溶解して腫瘍免疫治療剤が調製される。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0027

【補正方法】変更

【補正内容】

【0027】(2) 医薬組成物の調製

本発明の末端に2, 5-アンヒドロマンニトール基を有する分子量1, 500~10, 000のキトサンオリゴマー及びその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有してなる腫瘍免疫治療剤は、人及び人以外の動物に、その投与経路に応じた適当な剤形とした医薬組成物に形成される。具体的には静注、筋注等の注射剤、直腸投与剤、油脂性座剤、水性座剤等の種々の形態に調製することができる。これらの中でも腫瘍の周囲或いは腫瘍内に分割して局部注射することが好ましい。これらの各種製剤は、通常用いられている賦形剤、増量剤、結合剤、湿潤化剤、崩壊剤、表面活性剤、滑沢剤、分散剤、緩衝剤、保存剤、溶解補助剤、防腐剤、矯味矯臭剤、無痛化剤、安定剤等を配合して、常法によって製造することもできる。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0028

【補正方法】変更

【補正内容】

【0028】[I I I] 治療

(1) 治療対象

本発明の腫瘍免疫治療剤を用いることにより効果を発揮

することができる病状としては、各種腫瘍細胞によって生じた、いぼ状、茸状、ポリープ状、乳頭状、樹皮状、ハナキャベツ状等の形状をした腫瘍であり、病理学的には、乳頭腫、腺腫等の良性上皮性腫瘍や、線維腫、脂肪腫、軟骨腫、骨腫、筋腫、血管腫等の非良性上皮性腫瘍、或いは、癌腫等の悪性上皮性腫瘍や、肉腫等の悪性非上皮性腫瘍を挙げることができる。これら腫瘍の中でも、特に血管、リンパ管等を通じて他の臓器に遠隔転移して、生体の生命まで奪うまでに増殖する癌腫及び肉腫等の悪性の腫瘍において特に顕著な効果が認められる。これら腫瘍に適用する場合には、後述のように、免疫異種抗体による免疫異物除去作用が発揮されるためであろうと思われる。また、上記腫瘍に特別に効果が認められるが、腫瘍においても免疫効果を発揮することができ、腫瘍の場合には手術による切除を行なわなくても治療することができる。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0030

【補正方法】変更

【補正内容】

【0030】(b) 投与量

本発明の腫瘍免疫治療剤の投与量としては、動物試験の結果及び種々の状況を勘案して、連続的又は完結的に投与した時に総投与量が一定量を越えないように定められる。具体的には投与量は、投与方法、患者又は被処理動物の状況、例えば、年齢、体重、性別、感受性、食餌、投与時間、併用する薬剤、患者又はその病気の程度に応じて変化することとは言うまでもなく、また、一定の条件の下における適量と投与回数は、上記指針を基として専門医の適量決定試験によって決定されなければならない。具体的には、単回投与毒性については、今のところ観察されていないが、投与量としては体重1kg当たり100mg以下で、有意量の投与をすれば良い。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0043

【補正方法】変更

【補正内容】

【0043】

表 1

	動物	種	類	性別	発生 部位	大きさ	腫瘍の状況		転帰	組織分類
							初診	投与後		
実施例 1	犬	チャウ	雄	腹壁	手拳大	固着	分離	治癒	体表腫瘍	
		チャウ								
実施例 2	犬	雑種	雄	前腕	鶏卵大	固着	分離	治癒	悪性神経鞘腫	
実施例 3	犬	柴	雄	肛門	ビー玉大	固着	分離	治癒	肛門腺腫	

【手続補正 11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】変更

【補正内容】

【図面の簡単な説明】

【図 1】図 1 は、本発明実施例において分画された分子量 25,000～1,300 の 2,5-アンヒドロマンニトール基を有するキトサンオリゴマーの赤外線分析によって描かれた図である。

【図 2】図 2 は、本発明実施例において分画された、第 1 分画の 2,5-アンヒドロマンニトール基を有するキトサンオリゴマーの高速液体クロマトグラフィー分析によって描かれた図である。

【図 3】図 3 は、本発明実施例において分画された、第 2 分画の 2,5-アンヒドロマンニトール基を有するキトサンオリゴマーの高速液体クロマトグラフィー分析によって描かれた図である。

【図 4】図 4 は、本発明実施例において分画された、第 3 分画の 2,5-アンヒドロマンニトール基を有するキトサンオリゴマーの高速液体クロマトグラフィー分析によって描かれた図である。

【図 5】図 5 は、本発明実施例において分画された、第 4 分画の 2,5-アンヒドロマンニトール基を有するキトサンオリゴマーの高速液体クロマトグラフィー分析に

よって描かれた図である。

【図 6】図 6 は本発明実施例における生物の腫瘍部位の形態の外観を表わす写真である。

【図 7】図 7 は、本発明実施例における腫瘍と健常組織との限界が明瞭に分離されていることを示す生物の形態を表わす写真である。

【図 8】摘出された腫瘍における生物の病理組織学的所見を示す写真である。

【符号の説明】

- a-1 原料キトサン、
- a-2 分子量 40,000～1,300 の 2,5-アンヒドロマンニトール基を有するキトサンオリゴマー、
- a-3 酢酸ナトリウム、
- b-1 原料キトサン、
- b-2 分子量 45,000～1,300 の 2,5-アンヒドロマンニトール基を有するキトサンオリゴマー、
- b-3 酢酸ナトリウム、
- c-1 分子量 25,000～1,000 の 2,5-アンヒドロマンニトール基を有するキトサンオリゴマー、
- c-2 酢酸ナトリウム、
- d-1 分子量 25,000～1,300 の 2,5-アンヒドロマンニトール基を有するキトサンオリゴマー、
- d-2 分子量 1,300～900 の 2,5-アンヒドロマンニトール基を有するキトサンオリゴマー、
- d-3～7 各種塩

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.